Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.1, Spring 2020, P. 145-159
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۱۵۹-۱۴۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌سازی ریزازدیادی ماميران (*Chelidonium* sp.) و بررسی میزان فنول تام در اندام‌های مختلف آن در شرایط درون‌شیشه‌ای

مسعود قاسمی[۱]- حسین آرویی[۲*]- پژمان آزادی[۳]- آتوسا علی احمدی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۴

چکیده

ماميران(*Chelidonium* sp.) دارای رویشگاه‌های محدودی در ایران است. این گیاه حاوی مقدار زیادی متابولیت‌های ثانویه نظیر آلکالوئیدهای ایزوکینولین و ترکیبات فنولی می‌باشد. هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی ریزازدیادی و مقایسه فنول تام موجود در برگ، ساقه و ریشه گیاهچه‌های آن است. آزمایش به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. در این تحقیق ابتدا اثر سایتوکینین‌های BAP در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر و TDZ در غلظت‌های صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بررسی شد. سپس بهترین تیمار سایتوکینین از نظر درصد باززایی به صورت ترکیب با یکی از اکسین‌های IBA وNAA در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شد. شاخه‌های باززایی شده به منظور ریشه‌زایی برروی محیط کشت‌های MS حاوی ۳ گرم در لیتر زغال فعال با تیمارهای IBA، NAA و IAA در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده سازگار شدند. برای اندازه‌گیری میزان فنول تام از روش فولین استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین پرآوری در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ با میانگین ۸/۱۲ عدد شاخه بدست آمد. در این مطالعه محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، مناسب‌ترین تیمار به منظور ایجاد ریشه تشخیص داده شد. همچنین نتایج نشان داد، میزان فنول تام برگ بیشتر از ساقه و ریشه است.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریزازدیادی، فنول تام، ماميران

مقدمه

ماميران با نام علمی *Chelidonium majus* L.، و با نام لاتین Greater celandine از تیره خشخاش (Papaveraceae)، در گستره وسیعی از آسیا و اروپا رویش دارد. نمونه‌هایی از این گیاه در استانهای مازندران، گلستان، گیلان و آذربایجان مشاهده شده است (۱۴). گیاه ماميران خاصیت ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد التهابی دارد (۶). این گیاه دارای مقدار زیادی متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدهای ایزوکینولینی [۵] از جمله کلیدونین [۶]، سنگوئینارین [۷]، کپتسین [۸]، بربرین [۹] و ترکیبات فنولی می‌باشد (۱۵). کشت بافت گیاهی استفاده گسترده‌ای دارد که از جمله کاربردهای آن می‌توان به ریزازدیاری گونه‌های گیاهی که تکثیر طبیعی آنها مشکل است، ایجاد تنوع سوماکلونال و بهره‌گیری از خصوصیات مفید بدست آمده در برنامه‌های اصلاحی و بهره‌گیری از این تکنیک در فرآیند مهندسی ژنتیک و حفاظت از ذخایر ژنتیکی اشاره نمود (۱۰). پیرامون باززایی مستقیم گیاه ماميران و اندازه‌گیری فنول تام اندام‌های گیاهچه ماميران گزارش‌های اندکی وجود دارد. مطالعاتی در مورد باززایی و اندازه‌گیری میزان فنول تام اندام‌های گیاهچه‌های ماميران و برخی گیاهان دارویی انجام شده است که به طور نمونه می‌توان به آنها اشاره نمود: اسفندیار و همکاران (۸)، بیشترین باززایی و تولید برگ را در گیاه ماميران از کالوس‌های کشت شده در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آوردند. شائیک و

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: aroiee@um.ac.ir
۳- استادیار، گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
۴- استادیار، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

DOI: 10.22067/jhorts4.v34i1.81895

5- Isoquinonoline Alkaloids
6- Chelidonine
7- Sanguinarine
8- Captesine
9- Berberine

همکاران (۲۱)، بیشترین تعداد شاخه باززایی شده را از میانگره خیار چنبر تلخ (*Momordia charanti*) در محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و بیشترین ریشه‌زایی را در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش نمودند. باقل وبانسال (۲)، بیشترین تعداد شاخه را از جوانه انتهایی گیاه دان سیاه (*Guizotia abssinica*) را در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بدست آورند. صدیقی و همکاران (۲۰) نشان دادند که تولید ترکیبات فنولیکی در گل آذین‌های انگور درغلظت ۲ و ۴ میکرومولار هورمون بنزیل آمینوپورین در ترکیب با ۴/۹ میکرومولار ایندول بوتیریک اسید کاهش یافت ودر محیط عاری از هورمون، تولید ترکیبات فنولیکی در گل آذین انگور افزایش یافت. مامیران دارای رویشگاه‌های محدودی در ایران است. به همین دلیل ریزازدیاری می تواند روش مؤثری برای تکثیر سریع و انبوه و حفاظت از آن محسوب شود که منجر به تولید گیاهان با یکنواختی بالا می شود. در پژوهش حاضر تأثیر تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی مستقیم گیاه مامیران بررسی شده است تا ضمن بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای آن بستر مناسب برای انجام سایر پژوهش‌ها نظیر انتقال ژن و نیز افزایش کمیت و کیفیت مواد مؤثره از طریق دست‌ورزی ژنتیکی فراهم شود. همچنین مقدار فنول تام اندام‌های گیاهچه‌های مامیران مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد گیاهی و شرایط کشت

به منظور بررسی اثر برخی تنظیم کننده‌های رشد بر باززرایی گیاه دارویی مامیران، بذور این گیاه از ارتفاعات شیطان کوه لاهیجان جمع‌آوری شدند (شکل ۸ـA). سپس با هدف از بین بردن آلودگی در ابتدا بذور با آب مقطر دارای چند قطره توئین شسته شده، سپس با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و با آب مقطر دوبار شستشو داده شدند. سپس با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه، ضدعفونی شده و مجدداً با آب مقطر در سه مرحله زمانی ۵، ۱۵ و ۱۸۰ دقیقه زیر هودلامینار شستشو داده شدند و بعد از مراحل آلودگی‌زدایی، در محیط MS دارای ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۳ گرم در لیتر زغال فعال و ۸ گرم در لیتر آگار که pH محیط آن بر روی ۵/۸ تنظیم شده بود کشت شدند (۸). سپس تمامی کشت‌ها در اتاقک رشد در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

پرآوری و ریشه‌زایی

برای مطالعه پرآوری از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای (شکل ۸ـC)، میانگره‌هایی به طول ۲/۵ سانتی‌متر، در محیط‌های MS حاوی ساکارز۳۰ گرم در لیتر و ۳ گرم در لیتر زغال فعال و با تیمارهای هورمونی BAP در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر و TDZ در غلظت‌های صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. پس از بررسی درصد باززایی، بالاترین تیمار هورمونی از نظر درصد باززایی به صورت ترکیب با یکی از اکسین‌های IBA و NAA در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. شاخه‌های باززایی شده به منظور ریشه‌زایی برروی محیط‌های MS حاوی ساکارز ۳۰ گرم در لیتر و ۳ گرم در لیتر زغال‌فعال با تیمارهای IBA، NAA و IAA در غلظت‌های (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) واکشت شدند. یک ماه پس از کشت، صفات تعداد شاخه، طول شاخه و شاخص ظرفیت تشکیل شاخه، تعداد ریشه و طول ریشه گیاهچه‌های مامیران محاسبه شد. شاخص ظرفیت تشکیل شاخه طبق فرمول ذیل بدست آورده شد:

۱۰۰/(میانگین تعداد شاخه در هر ریز نمونه) x (درصد تشکیل شاخه) = شاخص ظرفیت تشکیل شاخه

مرحله سازگاری

گیاهان ریشه‌دار با آب ولرم شستشو داده شده و در گلدان با قطر دهانه ۷ سانتی‌متر که ترکیبی از کوکوپیت، پرلیت، پیت ماس با نسبت‌های مختلف پر شده بودند، قرار داده شدند (جدول ۱). گلدان‌ها با مقدار کمی آب مقطر مه‌پاشی و به منظور حفظ رطوبت، روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شده و به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. برای انجام سازگاری تدریجی روزی یکبار سرپوش را برداشته و اندکی مه‌پاشی انجام شد. پس از دو هفته به منظور سازگار شدن گیاهان با محیط بیرون منافذی در سرپوش ایجاد شد تا اینکه سرپوش‌ها به طور کامل برداشته و بعد از دو هفته گیاهان به گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی۵۰ درصد انتقال یافتند و درصد سازگاری بعد از یک ماه محاسبه شد.

جدول ۱- بسترهای کشت مورد استفاده به منظور سازگاری گیاهچه‌های مامیران

Table 1- Media used for acclimatization of *Chelidonium majus* L. plantlets

بستر Medium	نسبت اجزای بسترهای کشت Media component ratio		
	کوکوپیت Cocopeat	پرلایت Perlite	پیت ماس Peat moss
A	2	1	-
B	1	1	1
C	1	2	1
D	1	1	-
E	-	1	1

استخراج عصاره

ابتدا نمونه‌های برگ، ریشه و ساقه خشک شده با آسیاب به صورت پودر در آمدند. برای استخراج، ۵ گرم نمونه گیاهی توزین نموده و سپس، پنج میلی‌لیتر متانول به آن اضافه نموده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام التراسونیک قرار گرفت. سپس عصاره‌ها توسط کاغذ صافی صاف شده و سپس توسط دستگاه روتاری تغلیظ شدند، و در نهایت بر روی عصاره‌های خشک شده متانول ریخته تا در نهایت عصاره‌های ۱۰۰ppm از آن‌ها تهیه شد (۵).

تعیین مقدار فنول تام درگیاهچه‌های درون شیشه‌ای

برای اندازه‌گیری مقدار فنول تام برگ، ساقه و ریشه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای ماميران از روش فولین[1] استفاده شد. به همین منظور، یک میلی‌لیتر از عصاره یا محلول استاندارد گالیک اسید (۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به چاهک‌های دارای نه میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده و یک میلی‌لیتر فولین افزوده شدند. بعد از پنج دقیقه، ده میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷ درصد به چاهک‌ها افزوده گردید. در نهایت پلیت الیزای حاوی محلول به مدت نود دقیقه در دمای اتاق روی شیکر تکان داده شد. سپس جذب آن روی طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. این آزمایش در ۳ تکرار انجام گردید (۵).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های مربوط به پرآوری و ریشه‌زایی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای هر تیمار که هر تکرار حاوی ۴ ریزنمونه بود انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام و نمودارها توسط نرم‌افزار EXCEL رسم شدند.

نتایج و بحث

تعداد شاخه گیاهچه ماميران

نتایج حاصل از بررسی اثرات هورمون‌ها، شاخه‌زایی گیاهچه ماميران در کشت درون شیشه‌ای نشان داد که هورمون TDZ در مقایسه با سایر هورمون‌ها ازکارآمدی و اثرگذاری بیشتری بر شاخه‌زایی برخوردار بود. همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون TDZ بر صفت شاخه‌زایی ماميران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. همچنین برای صفت شاخه‌زایی، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ با میانگین ۸/۱۲ شاخه در گیاهچه، بالاترین شاخه‌زایی را از خود نشان داد (شکل۸ –D) که با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ اختلاف معنی‌داری نداشت که دلیل این امر این است که TDZ در غلظت‌های پایین تعداد شاخه زیادی تولید می‌کند (۱۷). کمترین شاخه‌زایی نیز مربوط به محیط شاهد بود. با افزایش میزان هورمون TDZ، شاخه‌زایی کاهش یافت. به طوری‌که در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ، میانگین شاخه‌زایی به ازای هر نمونه ۴ عدد شاخه در ریزنمونه بود. همچنین بهترین تیمار TDZ توانایی ۱۰۰ درصد شاخه‌زایی را نسبت به شاهد داشت. مطالعات انجام شده توسط فیصل و همکاران (۹) نشان داد که هورمون TDZ با غلظت ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر بر روی ریزنمونه‌های گره، بهترین نتیجه را برای شاخه‌زایی روولفیا[2] در بین غلظت‌های ۲/۲ تا ۰/۱۱میلی‌گرم در لیتر بوده که صحت نتایج این تحقیق را تایید می‌نماید. در مطالعه احمد و همکاران (۱) بر روی پرآوری ریزنمونه‌های گره فلفل دلمه[3]، بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت حاوی ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ بدست آمد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در تحقیقی حسین و همکاران (۱۱) با استفاده از غلظت ۰/۰۸۸ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین درصد باززایی در گیاه کینو[4] در گره‌های کوتیلدونی را از بین غلظت‌های ۲/۲ تا۰/۰۲۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ بدست آوردند. که صحت نتایج این تحقیق را اثبات می‌کند. اثر هورمون BAP بر شاخه‌زایی گیاهچه ماميران نیز نشان داد، بیشترین شاخه‌زایی در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر این هورمون با میانگین ۵/۱۸ ایجاد شد که با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار داشت. همچنین نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر صفت شاخه‌زایی ماميران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. همچنین ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ با اکسین‌های IBA و NAA تأثیر کمتری بر شاخه‌زایی ماميران داشت (شکل ۱). به طوری که در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA میانگین شاخه‌زایی ۰/۵ بود.

طول شاخه گیاهچه ماميران

مقایسه نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های مورد بررسی در این تحقیق بر روی افزایش رشد طولی شاخه گیاهچه ماميران نشان داد که هورمون BAP، مناسب‌ترین هورمون به منظور

1- Folin

2– *Rauwolfia tetraphylla*

3- *Capsicum annuum*

4- *Kino*

افزایش طول شاخه در مقایسه با هورمون‌های دیگـر مـی باشـد. اثـر غلظت‌های مختلف هورمون BAP، بر روی رشد طولی شاخه نشـان داد که بلندترین شاخه‌ها در تیمار ۲ میلی‌گـرم در لیتـر ایـن هورمـون ایجاد شد و مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهـای ۲ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در سطح احتمال پنج درصد نشان نـداد و در بین تیمارهای مورد آزمون، تیمارهای ۲ و ۱/۵ میلـی‌گـرم در لیتـر BAP با میانگین ۴ و ۳/۷ سانتی‌متر، بیشترین میانگین طول را نشان داده و در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲)، همچنین با کاهش غلظـت این هورمون، طول شاخه به حدود ۳/۳ سانتی‌متر، به میزان ۱۷ درصد کاهش داشت.

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخه‌زایی گیاه مامیران درغلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد

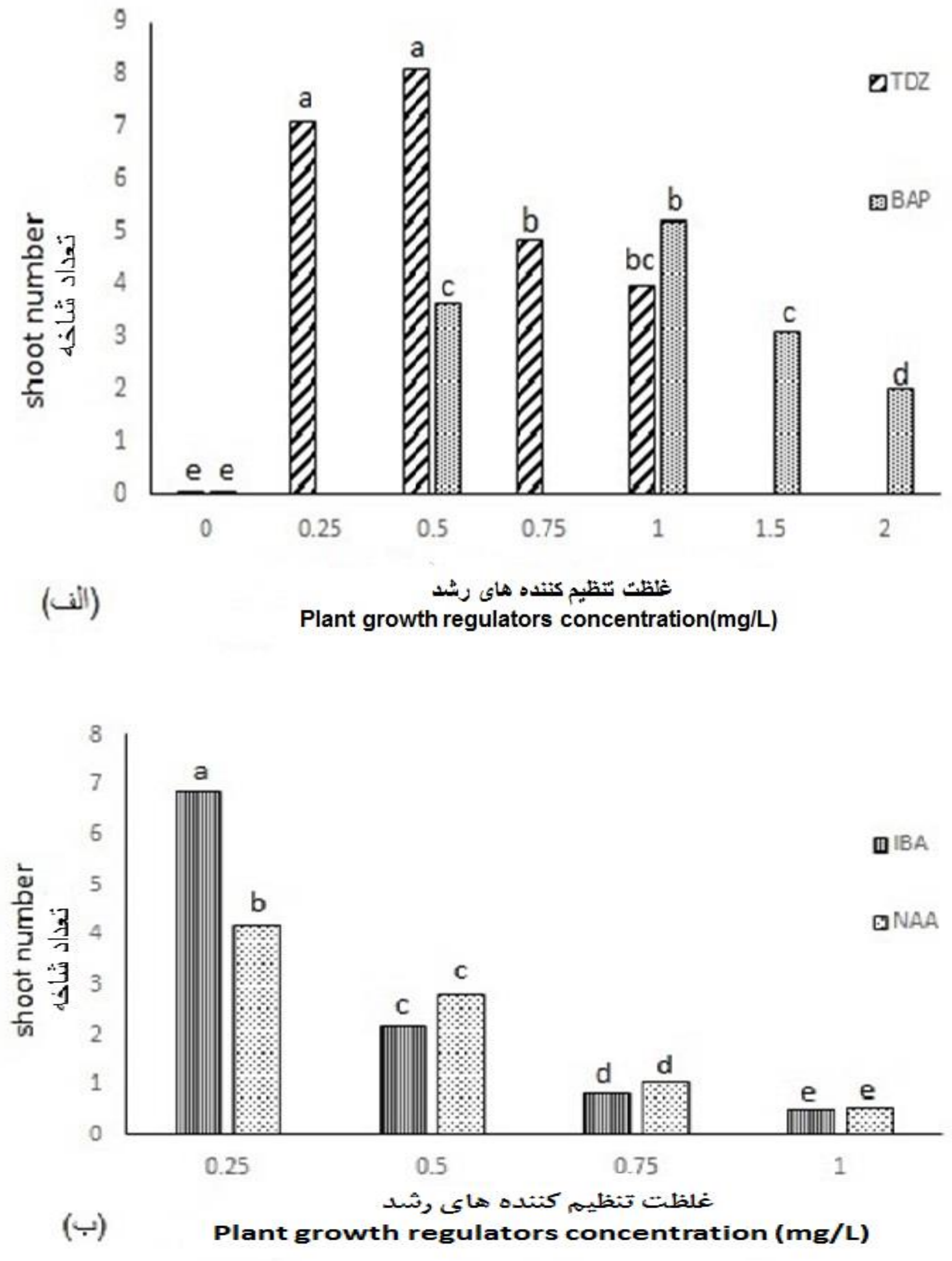
Table 2- ANOVA for *Chelidonium majus* L. shoot proliferation at different concentrations of PGRs

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean of squares
تیمار TDZ TDZ treatment	4	40.14**
خطای آزمایش Error	15	0.57
کل Total	19	
تیمار BAP BAP treatment	4	14.96**
خطای آزمایش Error	15	1.08
کل Total	19	
تیمار 0.5 TDZ+IBA 0.5 TDZ+IBA treatment	3	34.73**
خطای آزمایش Error	12	0.79
کل Total	15	
تیمار 0.5 TDZ+NAA 0.5 TDZ+NAA treatment	3	11.05**
خطای آزمایش Error	12	0.24
کل Total	15	

هورمون TDZ تأثیر کمتری بر رشد طولی شاخه نشان داد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهـد کـه اثـر غلظـت‌هـای مختلـف هورمون TDZ و همچنین ترکیب آنها با اکسین‌هـا بـر صـفت طـول شاخه مامیران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار اسـت. در تحقیـق حسین و همکاران (۱۱) در گره‌های کوتیلدونی کینو با افزایش غلظت TDZ از رشد طولی شاخه کاسته شد و بیشترین رشد طولی شـاخه در غلظت ۱/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP حاصل شد که صحت نتایج ایـن تحقیق را اثبات می‌کند. در مطالعه‌ای راجسـواری و پـالیوال (۱۹) بـر روی گره کوتیلدونی گل ابریشم[1] با اسـتفاده از غلظـت‌هـای مختلـف بنزیل آمینوپورین و آدنین و کینتین، بیشترین رشـد طـولی شـاخه در غلظت ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۳۵ میلی‌گرم در لیتـر آدنـین بدست آمد که با نتایج مالیک و همکاران (۱۶) که بر روی ریزازدیادی گیاه گارسـینی[2] مطالعـه کردنـد و نشـان دادنـد کـه هورمـون BAP بیشترین نقش را در افزایش رشد طولی شـاخه دارد همخـوانی دارد و هر دو نتایج این تحقیق را تایید مـی‌کنـد. بیشـترین رشـد طـولی در مامیران در میان تیمارهای TDZ ، تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ بـا میانگین ۲/۹ سانتی‌متر و در تیمارهای TDZ ترکیـب بـا اکسـین‌هـا، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، با میانگین ۳/۶ بیشـترین رشـد طـولی را بـه خـود اختصـاص دادنـد. همچنین تیمارهای TDZ ترکیب با NAA تأثیر کمتری بـر افـزایش رشد طولی شاخه داشتند.

1- *Albizia odoratissima*

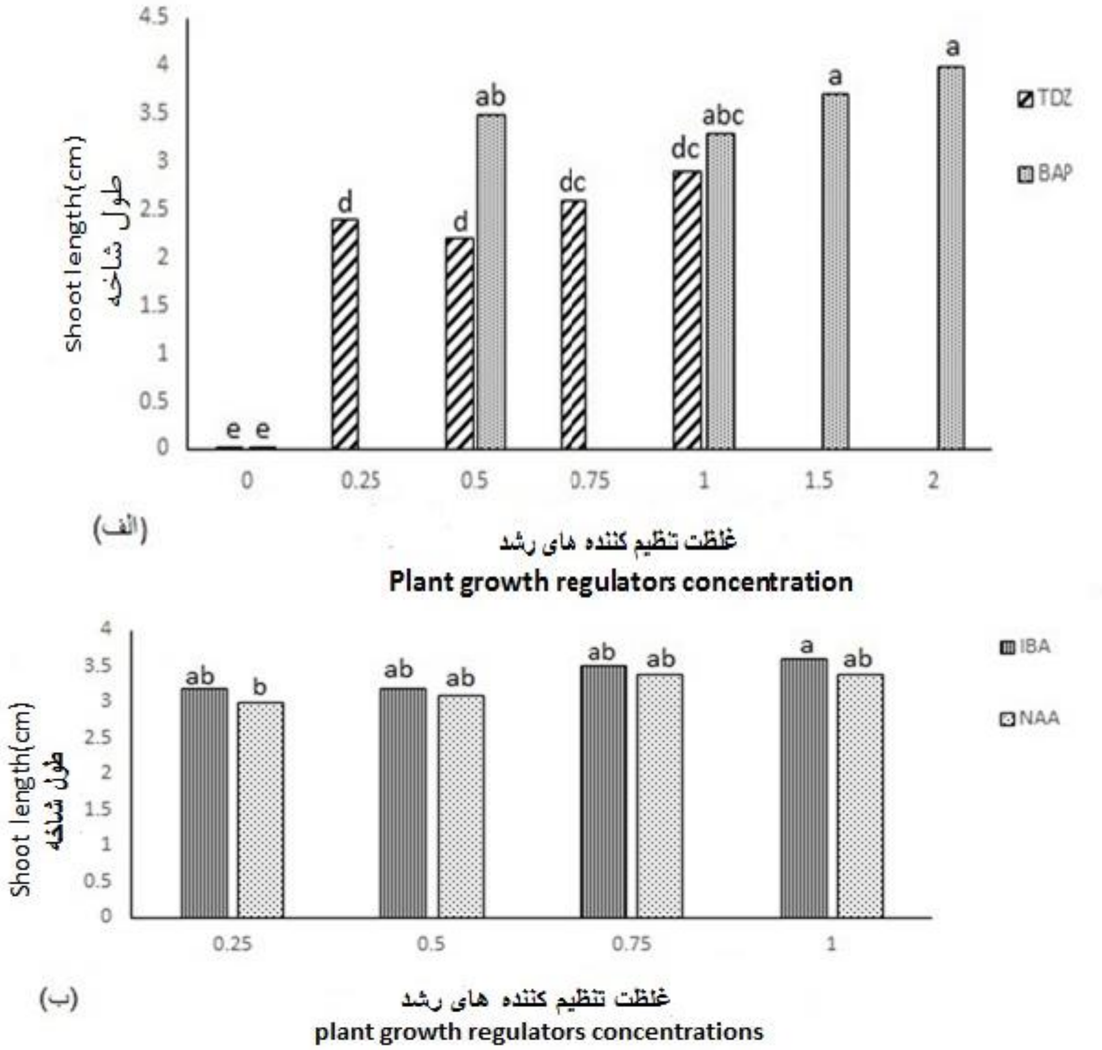
2- *Garcinia indica*



شکل ۱- مقایسه میانگین شاخه‌زایی ماميران در غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد سایتوکینین و اکسین

الف)- اثر سایتوکینین TDZ و BA. ب)- محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه غلظت‌های مختلف IBA و NAA

Figure 1- Means comparison of *Chelidonium majus* L. shoot proliferation at different concentrations of cytokinin and auxin
A) Effect of media containing TDZ and BA B) The medium contains 0.5 mg L^{-1} TDZ with various concentrations of IBA and NAA. (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۲- مقایسه میانگین رشد طولی شاخه مامیران درغلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین

الف)- اثر غلظت‌های مختلف سیتوکینین TDZ و BA. ب)- محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه غلظت‌های مختلف IBA و NAA

Figure 2- Means comparison of shoot elongation of *Chelidonium majus* L. at different concentrations of cytokinin and auxin

A) Effect of media containing TDZ and BA. B) The medium contains 0.5 mg L^{-1} TDZ with various concentrations of IBA and NAA. (LSD, $p\leq0.05$)

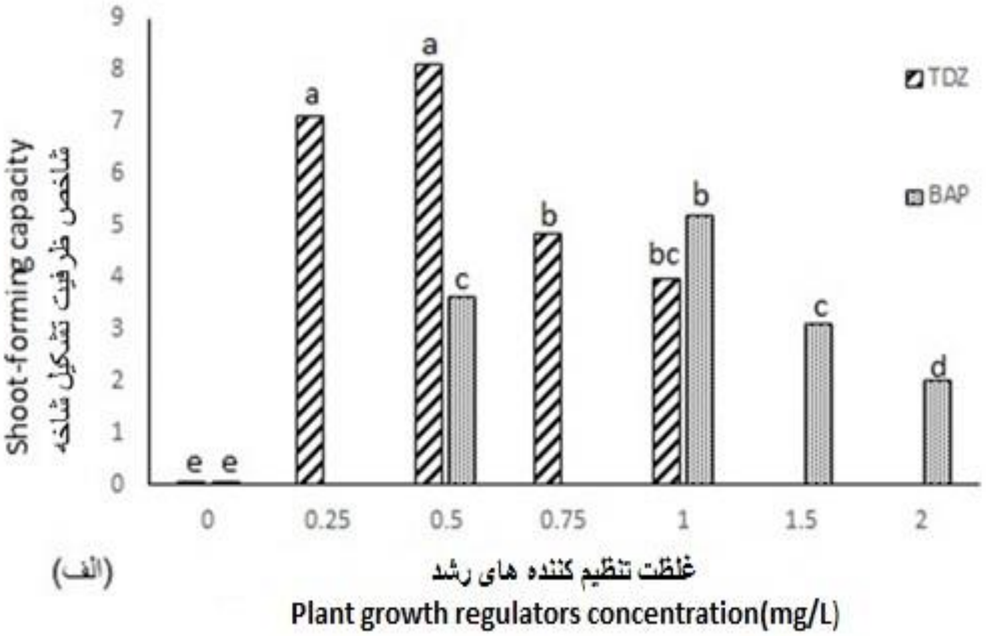
شاخص ظرفیت تشکیل شاخه گیاهچه مامیران

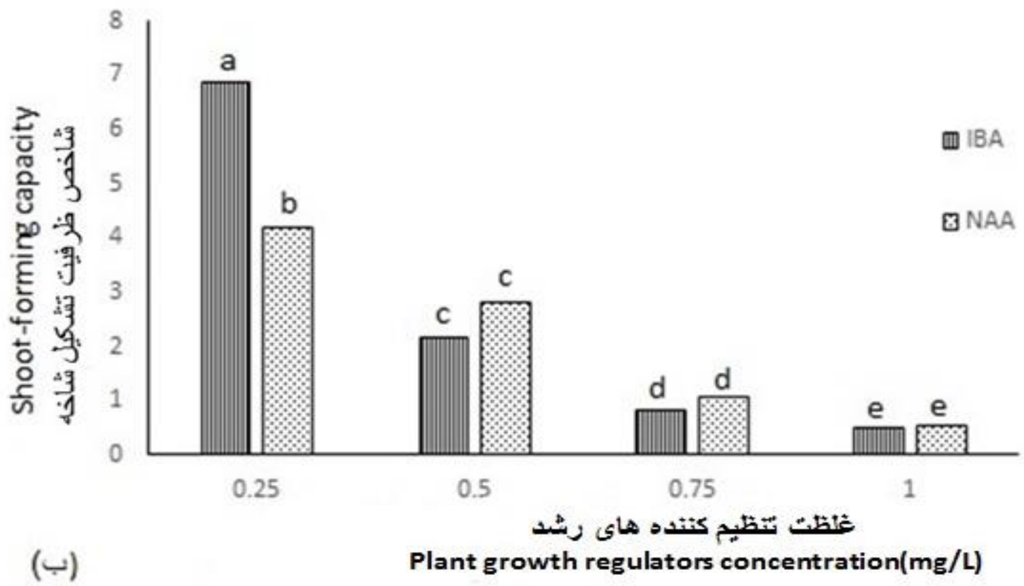
نتایج حاصل از تیمارهای شاخه‌زایی گیاهچه مامیران نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ در میان هورمون‌ها، بیشترین شاخص ظرفیت تشکیل شاخه را با میانگین ۸/۱۲ داد که با تیمارها ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ، اختلاف معنی‌داری ندارد (شکل۳). نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون TDZ بر صفت شاخص ظرفیت تشکیل شاخه مامیران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. بررسی‌های کاروپاسامی و کالیموتو (۱۳)، برروی گره‌های گیاه آندروگرافیس[1] نیز نشان داد که غلظت ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ، بالاترین شاخص ظرفیت تشکیل شاخه را در میان هورمون‌ها دارد. همچنین در بررسی‌های بختیار و همکاران (۳) با استفاده از غلظت‌های ۲/۹۷-۰/۴۸۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ موفق به شاخه‌زایی از میانگره‌های گیاه آویشن ایرانی[2] شدند و غلظت ۰/۹۹ میلی‌گرم در لیتر TDZ، بالاترین شاخص ظرفیت تشکیل شاخه را نشان دادند که نتایج این تحقیق را اثبات می‌کند. غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از تیمارهای شاهد در مامیران کمترین شاخص ظرفیت تشکیل شاخه را با میانگین ۰/۶۲ شاخه دارد. از طرف دیگر تیمارهای ترکیبی TDZ با اکسین‌ها، تیمار ۰/۵

1- *Andrographis neesiana*

2- *Thymus persicus*

میلی‌گرم TDZ با ۰/۲۵ میلی‌گرم IBA بالاترین شاخص ظرفیت شاخه را با ۶/۸۷ شاخه نشان داد که این تیمار در مقایسه با ۰/۵ میلی‌گرم TDZ، ۱۵ درصد شاخص ظرفیت تشکیل شاخه‌اش کاهش یافت.





شکل ۳- مقایسه میانگین شاخص ظرفیت تشکیل شاخه مامیران در غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشد مختلف

الف)- اثر غلظت‌های مختلف سیتوکینین TDZ و BA. ب)- محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه غلظت‌های مختلف IBA و NAA

Figure 3- Means comparison of shoot-forming capacity index of *Chelidonium majus* L. at different PGRs concentration

A) Effect of media containing TDZ and BA. B)-The medium contains 0.5 mg L^{-1} TDZ with various concentrations of IBA and NAA. (LSD, $p\leq 0.05$)

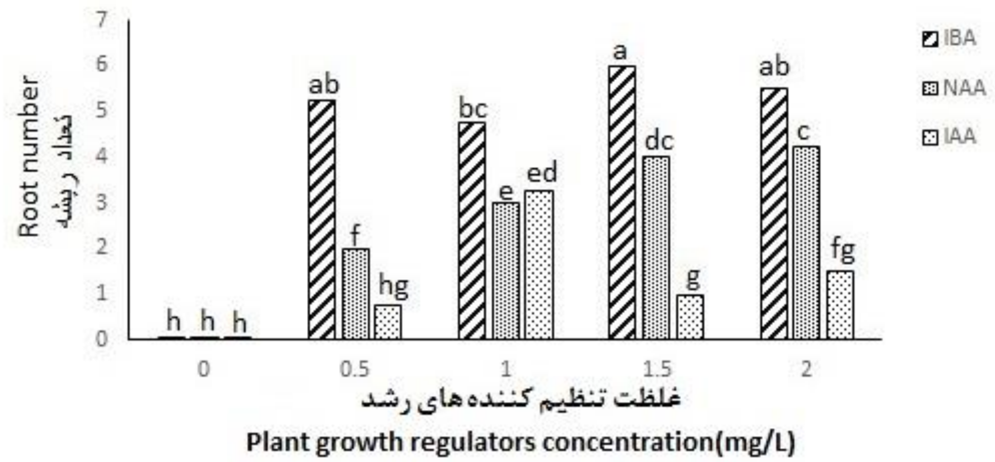
تعداد ریشه گیاهچه مامیران

نتایج حاصل از تیمارهای ریشه‌زایی گیاهچه مامیران با استفاده از اکسین‌های IBA، NAA و IAA نشان داد که هورمون IBA بهترین تاثیر را در افزایش تعداد ریشه تولیدی در بردارد. نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون IBA بر صفت تعداد ریشه مامیران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تعداد ریشه گیاه مامیران در غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده رشد اکسین

Table 3- ANOVA for root number of *Chelidonium majus* L. at different concentrations of auxin PGRs

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean of squares
IBA تیمار IBA treatment	4	21.82**
خطای آزمایش Error	15	0.35
NAAتیمار NAA treatment	4	11.95**
خطای آزمایش Error	15	0.4
IAAتیمار IAA treatment	4	5.92**
خطای آزمایش Error	15	0.3



شکل ٤ـ مقایسه میانگین تعداد ریشه مامیران در غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد اکسین

Figure 4- Means comparison of *Chelidonium majus* L. root number at differentplant growth regulators concentrations of auxin (LSD, *p≤0.05*)

همچنین برای صفت تعداد ریشـه تیمـار ۱/۵ میلـی‌گـرم در لیتـر IBA با ۶ عدد ریشه در گیاهچه، بالاترین ریشه‌زایی را از خود نشـان داد (شکل۸ –E) که بـا تیمـار ۲ میلـی‌گـرم در لیتـر IBA، اخـتلاف معنی‌داری نداشت. کمترین تعداد ریشه مربوط بـه تیمـار شـاهد بـود. بهترین غلظت IBA برای ریشه‌زایی گیاهچـه مـامیران توانـایی ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی را نسبت به تیمار شاهد داشت. در بررسی انـای (۱۸) در باززایی مستقیم گیاه پسته[1] از گره‌هایش، از بین غلظـت‌هـای ۰ تـا ۳/۹۷ میلی‌گرم در لیتر IBA، غلظت ۱/۹۸ میلی‌گرم در لیتر بهترین و موثرترین غلظت برای افزایش تعداد ریشه این گیاه اعلام شد کـه بـا نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنـین اثـرات مثبـت IBA بـه منظور ریشه‌زایی برخی گیاهان خانواده چتریان نظیر واناسوشاوا توسط کاروپاسامی و همکاران (۱۲)، شوید[2] توسـط شـارما و همکـاران (۲۲) گزارش شده که با نتایج این تحقیق نیـز مشـابهت دارد. بررسـی اثـر هورمون NAA بر تعداد ریشه گیاهچه مامیران (شـکل ۴) نشـان داد که بیشترین تعداد ریشه در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر این هورمـون بـا ۴/۲۵ عدد ریشه بوجـود آمـد. نتـایج جـدول تجزیـه واریـانس نشـان

1- *Pistacia vera*

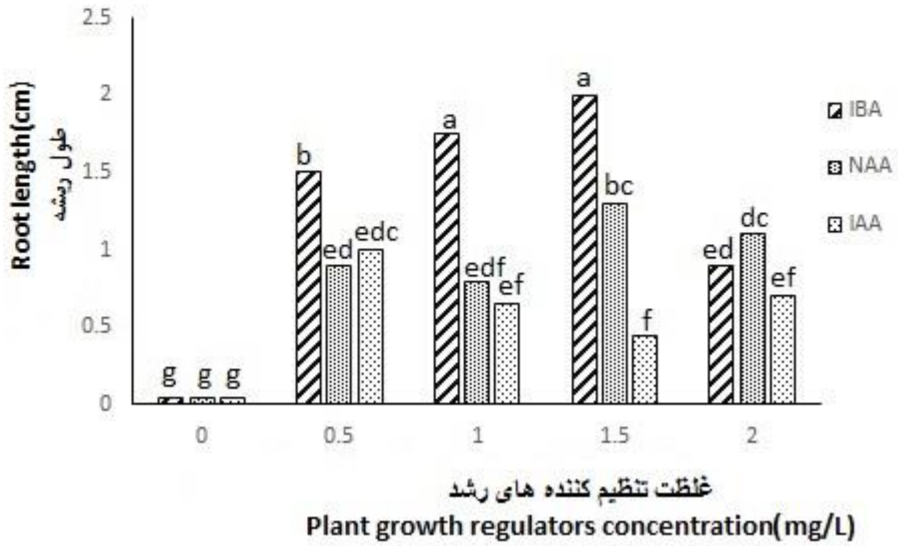
2- *Anethum graveolens*

می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون NAA بر صفت تعداد ریشه مامیران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. همچنین بررسی اثر هورمون IAA بر تعداد ریشه گیاهچه مامیران، نشان داد که بیشترین تعداد ریشه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۳/۲۵ ریشه بدست آمد. همچنین نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون IAA بر صفت تعداد ریشه مامیران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس طول ریشه گیاه مامیران در غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد اکسین

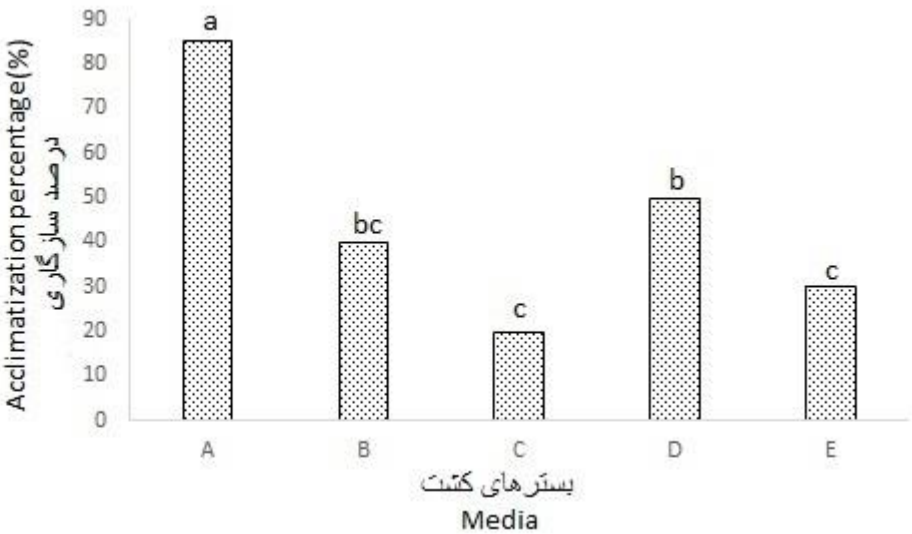
Table 4- ANOVA for root length of *Chelidonium majus* L. at different concentrations of auxins

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean of squares
تیمار IBA IBA treatment	4	2.55**
خطای آزمایش Error	15	0.26
تیمارNAA NAA treatment	4	0.95**
خطای آزمایش Error	15	0.04
تیمارIAA IAA treatment	4	0.53**
خطای آزمایش Error	15	0.04



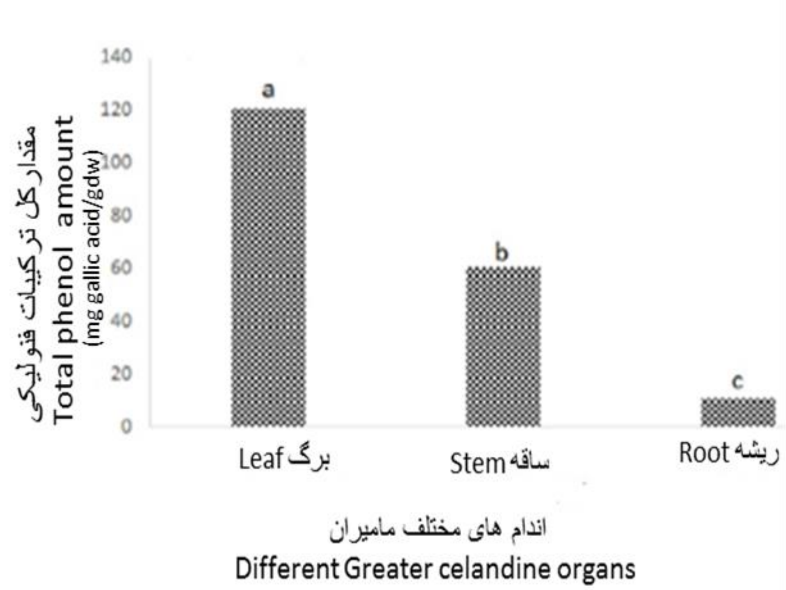
شکل ۵_ مقایسه میانگین طول ریشه مامیران درغلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد

Figure 5- Means comparison of *Chelidonium majus* L. length root at different concentrations of PGRs (LSD, *p≤0.05*)



شکل ٦- مقایسه میانگین اثر ترکیب‌های مختلف بسترهای کشت بر سازگاری گیاهچه‌های مامیران

Figure 6- Mean comparison of the effect of different combinations of media on plantlets *Chelidonium majus* L. acclimatization (LSD, *p≤0.05*)

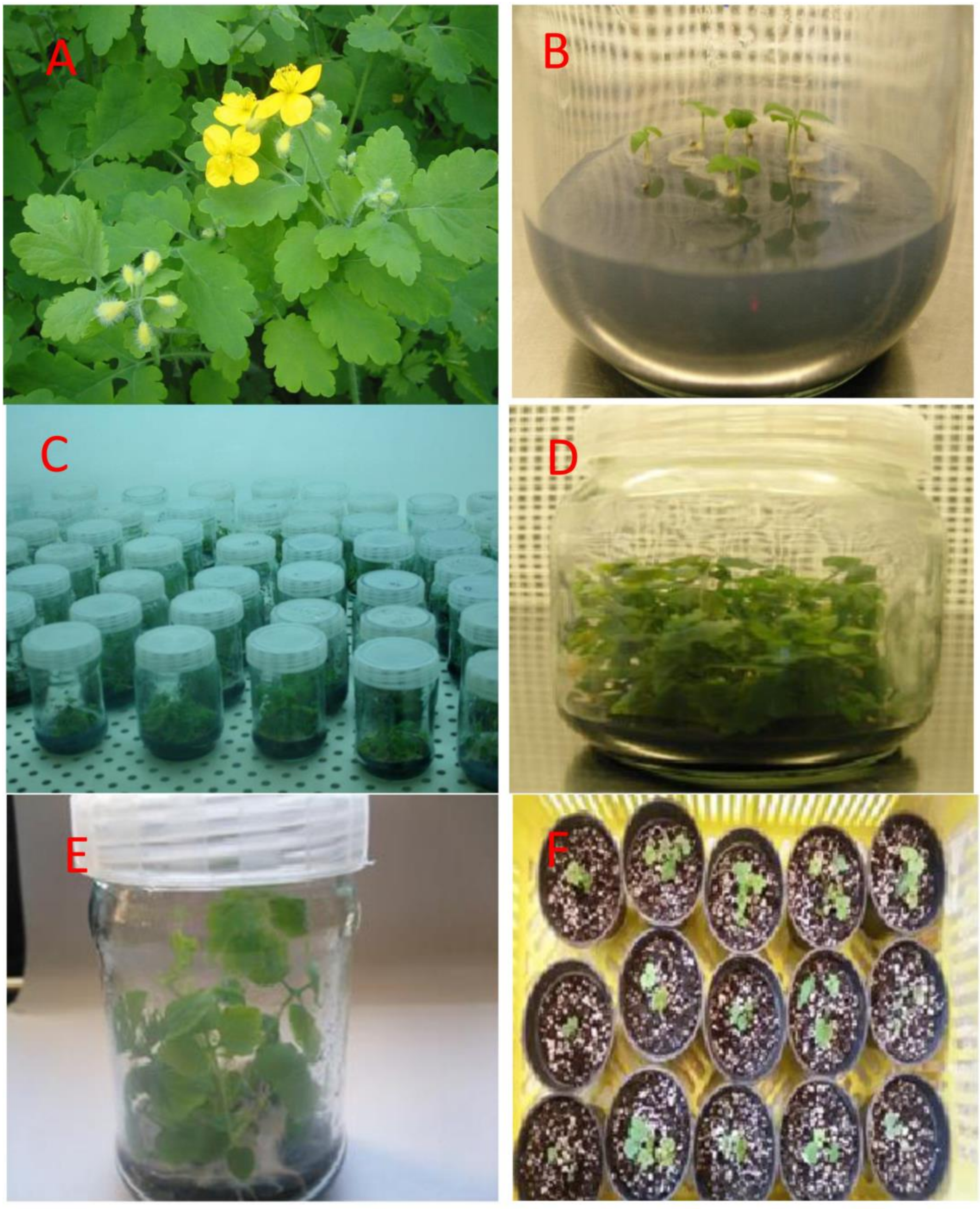


شکل ۷- مقایسه میانگین فنول تام اندام‌های مختلف مامیران

Figure 7- Mean comparison of total phenol content of various *Chelidonium majus* L. organs. (LSD, *p≤0.05*)

طول ریشه گیاهچه مامیران

نتایج حاصل از بررسی اثرات غلظت‌های مختلف هورمون‌ها بر افزایش رشد طولی ریشه گیاهچه مامیران نشان داد که هورمون IBA، بیشترین افزایش رشد طولی ریشه را در مقایسه با هورمون‌های دیگر دارد. اثر غلظت‌های هورمون IBA بر رشد طولی ریشه نشان داد که بیشترین رشد طولی ریشه در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر این هورمون با میانگین رشد طولی ۲ سانتی‌متر حاصل شدکه با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۵). نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون IBA بر صفت طول ریشه مامیران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. همچنین مشاهدات نشان می‌دهد که در بین غلظت‌های NAA بررسی شده، بیشترین رشد طولی ریشه در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۱/۳ سانتی‌متر بدست آمد.



شکل ۸- تکثیر درون شیشه‌ای مامیران

A.) گیاهان انتخاب شده به منظور جمع‌آوری بذر از ارتفاعات شیطان کوه لاهیجان B) تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از بذور در محیط کشت MS دارای ۳ گرم در لیتر زغال فعال C)- تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای بعد از ۳ ماه. D) پرآوری شاخه در محیط کشت MS دارای ۳ گرم در لیتر زغال فعال و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بعد از یک ماه E)- ریشه‌زایی در محیط کشت MS دارای ۳ گرم در لیتر زغال فعال و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بعد از یک ماه –F) سازگاری ۸۵ درصد گیاهچه‌های درون شیشه‌ای در بستر کشت ۲ : ۱ : ۰ پیت ماس، پرلیت و کوکوپیت

Figure 8- *In vitro* propagation of *Chelidonium majus* L.

A) Selected plants for seeds collection from the Shaytan kooh in Lahijan elevations. B) Production of *in vitro* plantlets from seeds in MS medium containing 3 g L^{-1} activated charcoal. C) Production of *in vitro* plantlets after 3 months. D) Shoot proliferation in MS medium containing 3 g L^{-1} activated charcoal and 0.5 mg L^{-1} TDZ after 1 month. E) Rooting in MS medium containing 3 g L^{-1} activated charcoal and 1.5 mg L^{-1} IBA after 1 month. F) Acclimatization of 85% *in vitro* plantlets in 0: 1:2 peat moss perlite and cocopeat medium

علاوه براین نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهـد کـه اثـر غلظت‌های مختلف هورمون NAA بر صفت طول ریشـه مـامیران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. علاوه بـر ایـن غلظـت‌هـای IAA بررسی شده، بیشترین رشد طـولی ریشـه در غلظـت‌هـای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۱ سانتی‌متر بدسـت آمـد و نتـایج جـدول تجزیه واریانس حـاکی از معنـی‌دار بـودن اثـر غلظـت‌هـای مختلـف هورمون IAA بر صفت طول ریشه مـامیران در سـطح احتمـال یـک درصد است. همچنین کمترین رشد طولی در تیمارهای شاهد مشاهده شد. در بررسی تأثیر غلظت‌های IBA در محیطهای MS ۱/۲ و MS توسط تیواری و همکاران (۲۳) بر روی آب بشقابی،[1] مشخص شد که بالاترین تعداد و طول ریشه در غلظت ۰/۵ میلـی‌گـرم در لیتـر IBA ایجاد شد. و در مطالعه دیگر توسط بانرجی و همکاران (۴) در گیاه آب بشقابی، بیشترین تأثیر در ریشه‌زایی را هورمون IBA داشت و در عین حال کمترین تأثیر را هورمون IAA نشان داد که با نتایج این تحقیـق همخوانی دارد.

مرحله سازگاری

به منظور سازگاری از نسبت‌های مختلف کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس استفاده شد و نتایج مقایسه میانگین درصد سـازگاری (شـکل۶) نشان داد که نسـبت ۲ : ۱ : ۰ پیـت مـاس، پرلیـت و کوکوپیـت اثـر معنی‌داری بر درصد سازگاری در مقایسـه بـا سـایر بسـترهای کشـت داشت و ۸۵ درصد گیاهان سازگار شدند. درحالی‌که با کاربرد نسبت ۱ : ۲ : ۱ پیت ماس، پرلیت و کوکوپیت کمترین درصد سازگاری (۲۰٪) بدست آمـد (شـکل ۸-F). همچنـین نتـایج جـدول تجزیـه واریـانس داده‌های حاصل از درصد سازگاری در مرحله سازگاری نشـان داد کـه نوع بسـترهای کشـت مـورد اسـتفاده در مرحلـه سـازگاری در سـطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

مقدار فنول تام در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد کـه اثـر انـواع بافـت‌هـای گیاهی بر صفت مقدار فنول تام معنی‌دار شده است. مقایسه میـانگین مقدار فنول تام این سـه بافـت نیـز نشـان داد کـه بـرگ مـامیران در مقایسه با ساقه و ریشه دارای میزان بالاتر (۱۲۰/۹۶ میلی‌گرم گالیـک اسید در گرم ماده خشک) و ریشـه دارای کمتـرین مقـدار فنـول تـام (۱۰/۹۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) در مقایسـه بـا دو بافت دیگر بود (شکل۷). در مطالعه‌ای که توسط دویر و همکـاران (۷) بر روی فنول تام اندام‌های گیاهچه‌های ویتانیا[2] انجام گرفت. بالاترین میزان فنول تام در برگ یافت شد. همچنین در مطالعه دیگر چـاوان و همکاران (۵) بر روی گیاه سروپجیا[3] یافتند که بـالاترین مقـدار فنـول تام در برگ‌ها وجود دارد که با این تحقیق مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش دستورالعمل ریزازدیادی گیاه دارویـی مـامیران بـا بیشترین تعداد شاخه در محیط کشـت MS دارای ۰/۵ میلـی‌گـرم در لیتر TDZ بدست آمد. و با افزایش میزان هورمون TDZ، شاخه‌زایـی کاهش یافت. به طـوری‌کـه در غلظـت ۱ میلـی‌گـرم در لیتـر TDZ، میانگین شاخه‌زایی به ازای هر نمونه ۴ عدد شاخه در ریزنمونه بـود. و همچنین بیشـترین تعـداد ریشـه در محـیط کشـت MS حـاوی ۱/۵ میلـی‌گـرم در لیتـر IBA بدسـت آمـد. و بررسـی میـزان فنـول تـام بخش‌های گیاهچه‌های مامیران نشان داد که برگ مامیران در مقایسه با ساقه و ریشه دارای میزان بالاتر (۱۲۰/۹۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) و ریشـه دارای کمتـرین مقـدار فنـول تـام (۱۰/۹۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) در مقایسه با دو بافت دیگر بود با توجه به این نتایج، این روش می‌تواند به عنوان روشـی کارآمـد برای تولید تجاری این گونه با ارزش در شرایط درون شیشه‌ای معرفی گردد.

1- *Centella asiatica*
2- *Withania somnifera*
3- *Cerpegia santapaui*

منابع

1- Ahmad N., Siddique I ., and Anis M. 2006. Improved plant regeneration in *Capsicum annum* L. from nodal segments. Biologia Plantarum 50 : 701-704.

2- Baghel S., and Bansal Y.K. 2014. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration and phytochemical screening of *Guizota Abssinica* – A MultiPurppose oil crop. A World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 4786: 1193–1217.

3- Bakhtiar Z., Mirjalili M.H., Sonboli A., and Farimani M. 2014. *In vitro* propagation, genetic and phytochemical assessment of *Thymus persicus*– A medicinally Important Source of pentacyclic triterpenoids. Biologia 69: 594–603.

4- Banerjee S., and Kumar S. 1999. *In vitro* multiplication of *Centella asiatica*. Current Science 76: 147-148.

5- Chavan J.J., Gaikwad N.B., Umdale S.D., Kshirsagar P.R., Bhat K.V., Yadav S.R. 2013. Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis, molecular profiling, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropaguted *Cerpegia Santapaui.* Plant Growth Regulation 72: 1-15.

6- Colombo M.L., and Bosisio E. 1996. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. Pharmaceutical Research 33: 127-134.

7- Dewir Y.H., Chakrabary D., and Paek Y. 2010. Indirect regenerative of *Withania somnifera* and Comparative analysis of Withanolides in *in vitro* and greenhouse grown plants. Biologia Plantarum 54: 357–360.

8- Esfandiar A., Kazemitabar S.K., and Kiani G.H. 2016. Investigation of callus induction and indirect shoot regeneration in *Chelidonium majus* L. affected by plant growth regulators. 30(3):656-671. (In Persian with English abstract)

9- Faisal M., Ahmad N., and Anis M. 2005. Shoot multiplication in *Rauwolfia tetraphylla* using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 187 – 190.

10- Hartman H.T.T., and Kester D.E. 1990. Plant propagation principles and practices. Prentice Hal, Inc, Engle Wood Cliffs.

11- Husain M., Anis M., and Shahzad A. 2007. *In vitro* propagation of Kino using thidiazuron. In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant 43: 59–64.

12- Karuppusamy S.C., Aruna V., and Pullaiah T. 2006. Micropropagation of *Vanasushava pedata*- An endangered medicinal plant of south India. Plant Tissue Culture and Biotechnology 16: 85–94.

13- Karuppusamy S., and Kalimuthu K. 2010. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis neesiana*: A valuable endemic medicinal plant. Advances in Biological Research 4: 211-216.

14- Kiani K. 2009. Atlas of medicinal plants. Zarghalam.

15- Kupeli E., Kosar M., Yesilada E., Itusnu K., and Baser C. 2002. A comparative study on the anti– inflammatory, antinociceptive and anti-Pyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* Species. Life Sciences 72: 645–657.

16- Malik S.K., Chaudhury R., Kalia R.K. 2005. Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree Species. Scientia Horticalturae 106: 539–553.

17- Nayak N.R., Rath S.H., and Patnaik S. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchid, *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum*, and *Dendrobium moschatum* through thidiazuron induced high frequency shoot proliferation. Scientia Horticulturae 71: 243-250.

18- Onay A. 2000. Micropapajation of pistachio from mature trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 159–163.

19- Rajesewary V., and Paliwal K. 2006. *In vitro* propagation of *Albizia Odoratissima* from cotyledonary node and leaf nodal explants. *In Vitro* Cellular and Developmentul Biology– Plant 42: 399–404.

20- Sedighi A., Sedighi Dehkordi F., Gholami M., and Rafieian Kopaei. 2014. Study of the effect of plant growth regulators, size and cultivar of grape inflorescence explant on production of phenolic compounds in an *in vitro* condition. Journal of Herbal Medicine Pharmacology 3: 35-40.

21- Shaik P., Samraju R., Chithakari R., and Mohammad M. 2016. TDZ induced *in vitro* plant regeneration of *Momordica balsamina* and *Momordica Charanta,* Important Medicinal Cucurbits. International Journal of Current Research 8: 31067–31070.

22- Sharma R.K., Wakhlu A.K., and Boleria M. 2004. Micropropagation of *Anethum graveolens* L. through axillary shoot proliferation. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 13: 157–159.

23- Tiwari K.N., Sharma N.C., Tiwari V., and Singh B.D. 2000. Micropropagation of *Centella asiatica*. A valuable medicinal herb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 179–185.

Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.1, Spring 2020, P. 145-159
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۱۵۹-۱۴۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Optimization of Micropropagation of *Chelidonium majus* L. and Study on Total Phenol Content in Different Organs *in Vitro* Conditions

M. Ghasemi[1]- H. Arouiee[2]*- P. Azadi[3]- A. Ali Ahmadi[4]

Received: 31-07-2019
Accepted: 25-11-2019

Introduction: Greater celandine (*Chelidonium* sp) is one of the plants that its propagation through seed occurs slowly. In addition, *Chelidonium majus* L. has limited habitats in Iran. For this reason, micropropagation can be considered as an effective method for its rapid and massive propagation and conservation, which can lead to the production of highly uniform plants. *Chelidonium majus* L. also contains a large amount of secondary metabolites of Isoquinoline alkaloids, including Chelidonine, Sanguinarine, Captesin, Berberrine and Chloritrine, and phenolic compounds. Therefore, the aim of this study was to investigate micropropagation of *Chelidonium majus* L. and compare the total phenol content in leaf, stem and root in obtained plantlets.

Materials and Methods: To begin the experiment, seeds of *Chelidonium majus* L. were first washed with distilled water containing a few drops of tween20. Then they were washed with 70% alcohol for 1 min and were finally washed with double-distilled water. Next, they were disinfected with 1% sodium hypochlorite for 5 min, and again were rinsed with distilled water for 3 times of 5, 15, and 180 min under laminar air flow hood. The effects of TDZ at concentrations 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/L, BAP at concentrations 0, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L considered. Then, the effect of best treatment in combination with NAA and IBA at 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/L on growth parameters (number of shoot, shoot length and shoot formation capacity index), were studied. The effect of IBA, NAA and IAA at 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L on rooting parameters (number of root and root length) in MS medium supplemented with 3 g/L activated charcoal in *in vitro* conditions were evaluated. Then different ratios of cocopeat, perlite and peat moss were used for acclimatization of the obtaining plants. Folin method was used to measure total phenol content. The experiment was conducted as factorial in a completely randomized design with four replications.

Results: The results of analysis of variance for proliferation and rooting traits showed that there were significant differences among the treatments at 1% probability level. The results of means comparison showed that the highest numbers of shoots and shoot formation capacity index were obtained from the treatment of 0.5 mg/L TDZ with the average of 8.12, which did not show a significant difference from the concentration of 0.25 mg/L TDZ, and the lowest shoot number was related to the control treatment. Increasing the amount of TDZ hormone led to the reduction in shoot number, so that at concentration of 1 mg/L TDZ, the average shoot number per explant was four. Combination of 0.5 mg/L TDZ with IBA and NAA had lower effect on *Chelidonium majus* L. proliferation. Moreover, the greatest shoot length was observed in the treatment of 2 mg/L BAP. Comparison of means values showed no significant difference between the treatments of 2 and 1.5 mg/L BAP at 1% probability level. In this study, MS medium containing 1.5 mg/L IBA was the most appropriate treatment for root formation. The effect of NAA hormone on root number of *Chelidonium majus* L. showed that the highest number of root was obtained from the treatment of 2 mg/L NAA. Besides, the effect of IAA on root number of *Chelidonium majus* L. showed that the highest number of root was observed in the treatment of 1 mg/L IAA, and the lowest number of root was related to the control treatment. The results of means comparison for the percentage of acclimatized plants showed that the ratio of 0:2:1 had a significant difference from the rest of the culture media and 85% of the plants were acclimatized, while the ratio of 1:2:1 showed the lowest percentage of acclimatization (20%). Furthermore, the results showed that the culture media had significant effect on acclimatization stage at 1% probability level. The results of the analysis of variance for total phenol content in leaf, stem and root tissues showed that there were significant differences among these three tissues. The results showed that the amount of total phenol in leaf was higher than in the stem, and the amount of phenol in root was

1 and 2- Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Horticulture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: aroiee@um.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Genetic Engineering, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj
4- Assistant Professor, Department of Biology, Medicinal Plant and Drug Institute, Shahid Beheshti University, Tehran

insignificant.

Conclusion: Based on the results of this study, micropropagation can be used as a method for commercial production of this species under *in vitro* conditions.

Keywords: *Chelidonium* sp, Micropropagation, Proliferation, Total phenol